

FACULTAD DE CIENCIAS
GRADO EN CIENCIAS DEL MAR
TRABAJO FIN DE GRADO
CURSO ACADÉMICO [2018-2019]

TÍTULO:

**DESARROLLO DE UN BIOSENSOR ELECTROQUÍMICO DE FOSFATO
PARA EL MEDIO MARINO**

AUTOR:

CELINA JORDÁ GARCÍA

RESUMEN

El deterioro de la calidad del agua de mar debido a la contaminación es un tema muy importante en la actualidad ya que ha aumentado con el paso de los años. El mayor aporte de residuos que desembocan en los mares y océanos se genera a partir de actividades terrestres como el desarrollo urbano, las actividades agrícolas, el turismo, etc. Para poder monitorear los niveles de contaminación marina es necesario el desarrollo de dispositivos sensores que permitan el control de especies contaminantes como metales pesados, compuestos organoclorados, hidrocarburos aromáticos, toxinas, etc. Por esta razón, en el presente estudio se han realizado ensayos para desarrollar un biosensor electroquímico capaz de medir la concentración de fosfato en el agua de mar. Para ello se ha escogido una reacción bioquímica que se cataliza por la enzima Fosfatasa alcalina (ALP), la cual es inhibida por el fosfato. El sustrato de la reacción es 4-Aminofenil fosfato (PAP), que en presencia de agua se hidroliza y genera como producto 4-Aminofenol (PAF). El producto de la reacción es electroactivo y cuando se oxida genera *para*-quinonaimina.

Se han utilizado electrodos serigrafiados de carbono en todos los ensayos para aplicar las técnicas voltamperométricas. De este modo se ha comprobado que tanto en medio acuoso como en agua de mar sintética el PAF presenta respuesta electroquímica, la ALP posee actividad catalizadora y que el fosfato inhibe la ALP. Por otra parte, se ha encapsulado la proteína ALP en una matriz de sílice a través del método de Sol-Gel y se ha obtenido respuesta catalizadora en la reacción de hidrólisis de PAP a PAF, de modo que se puede desarrollar un sensor que detecte fosfato utilizando este método.

Se ha escogido el fosfato como especie contaminante debido a que, en los océanos, el fósforo tiene una gran importancia como nutriente primario para organismos fotosintéticos y para autótrofos. Pero si este se encuentra en cantidades excesivas, induce el crecimiento desmesurado de algas y otros organismos provocando la eutrofización de las aguas. Cuando estas algas y otros vegetales mueren, al ser descompuestos por los microorganismos, se agota el oxígeno y se hace imposible la vida de otros seres vivos.

Palabras clave: biosensor electroquímico, fosfato, fosfatasa alcalina, agua de mar, voltamperometría.

ABSTRACT

The deterioration in the quality of seawater due to pollution is a very important issue today, as it has increased over the years. The greatest contribution of waste that flows into the seas and oceans is generated from terrestrial activities such as urban development, agricultural activities, tourism, etc. In order to monitor the levels of marine pollution, it is necessary to develop sensor devices that allow the control of contaminating species such as heavy metals, organochlorine compounds, aromatic hydrocarbons, toxins, etc. For this reason, in the present study, tests have been carried out to develop an electrochemical biosensor capable of detecting the phosphate concentration in seawater. For this, a biochemical reaction has been chosen that is catalyzed by the enzyme Alkaline Phosphatase (ALP), which is inhibited by phosphate. The substrate of the reaction is 4-Aminophenyl phosphate (PAP), which in the presence of water is hydrolyzed and generated as a product 4-Aminophenol (PAF). The product of the reaction is electroactive and when oxidized it generates *para*-quinoneimine.

Screen-printed carbon electrodes have been used in all tests and applied to the detection by voltammetric techniques. In this way, it has been found that in aqueous buffered medium and in synthetic seawater the PAF has an electrochemical response, the ALP has catalytic activity and the phosphate inhibits the ALP. On the other hand, the ALP protein has been encapsulated in a silica matrix through the Sol-Gel method and a catalytic response has been obtained in the hydrolysis reaction of PAP to PAF, so that a sensor that detects phosphate can be developed using this method.

Phosphate has been chosen as a contaminating specie because, in the oceans, phosphorus has a great importance as a primary nutrient for photosynthetic organisms and for autotrophs. But if it is found in excessive amounts, it induces the excessive growth of algae and other organisms causing the eutrophication of the waters. When these algae and other plants die due to decomposition by microorganisms, the oxygen is exhausted and the life of other organisms becomes impossible.

Key words: electrochemical biosensor, phosphate, alkaline phosphatase, seawater, voltammetry.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	4
2. MATERIAL Y MÉTODOS	10
2.1. Materiales	10
2.1.1. Reactivos	10
2.1.2. Electroodos	10
2.1.3. Fuentes de corriente y aparatos	11
2.2. Métodos	12
2.2.1. Preparación de disoluciones	12
2.2.2. Preparación de la matriz de sílice por el método Sol-Gel para el encapsulamiento de la proteína.....	13
2.2.3. Métodos electroquímicos	15
2.2.3.1. Voltamperometría cíclica.....	15
3. PLAN DE TRABAJO	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
4.1. Caracterización electroquímica de 4-Aminofenol.....	18
4.2. Cinética de formación de 4-Aminofenol	21
4.3. Cinética de formación de 4-Aminofenol en agua de mar sintética	26
4.4. Ensayos de inhibición con fosfato en agua de mar sintética	28
4.5. Desarrollo de un sensor: encapsulamiento de la Fosfatasa Alcalina.....	30
5. CONCLUSIONES	32
6. BIBLIOGRAFÍA	34

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, el control de la calidad de las aguas en el medio marino es un tema de elevado interés tanto en el ámbito científico como político y socioeconómico. Para poder estudiar y determinar los distintos contaminantes primero es necesario identificar su naturaleza, fuentes, distribución, concentración, persistencia y absorción en el medio.

La mayor parte del deterioro de la calidad de las aguas es debida a la contaminación marina que proviene de los residuos aportados a través de actividades terrestres como el desarrollo urbano, la manufactura, el transporte, la producción de energía, las actividades agrícolas, el turismo, etc. (Kathijotes, 2011). Estos contaminantes son transportados por filtraciones, aguas subterráneas, escorrentía de los ríos, incluso por el viento, hasta llegar a las zonas costeras donde desembocan en los mares. Por esta razón, la mayor concentración de contaminantes se sitúa en el litoral y, una vez allí, son desplazados por corrientes marinas y eólicas hasta zonas de mar adentro (Escobar, 2002).

Con el fin de realizar una monitorización de la contaminación marina es necesario el desarrollo de dispositivos sensores que permitan el control de especies contaminantes como metales pesados, compuestos organoclorados, hidrocarburos aromáticos, toxinas, etc. Hoy en día se han utilizado sensores en oceanografía para temperatura, conductividad, profundidad y turbidez, pero es el momento que la medición de los parámetros químicos y biológicos mejore (Kröger *et al.*, 2002).

Un sensor químico se puede definir como un dispositivo que transforma la información química en una señal analítica útil. Se compone de dos partes: un receptor, se encarga de reconocer el analito (sustancia objetivo) y traduce este acoplamiento en una información de tipo químico; y un transductor, que se encarga de convertir la información química procedente del receptor en una señal analítica (Figura 1).

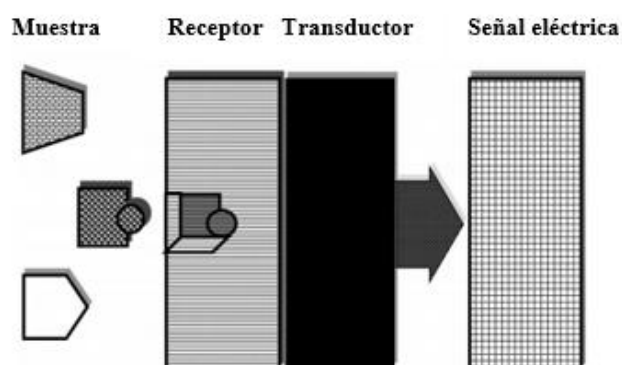


Figura 1. Esquema general de un sensor químico (Kröger *et al.*, 2002).

Esta configuración tan simple de reconocimiento y transducción es la que ha permitido el diseño de una instrumentación con características prácticas e innovadoras en el campo del análisis químico. El aspecto fundamental de este diseño es la generación de una señal suficientemente intensa entre el analito y un receptor selectivo de éste (Gómez y Alegret, 1997).

Los sensores químicos pueden clasificarse en varias categorías según la función del elemento transductor, en: ópticos, electroquímicos, eléctricos, piezoelectricos, calorimétricos, magnéticos, termométricos, etc.

Entre los dispositivos sensores más habituales destacan los sensores electroquímicos (Kissinger, 2005). Su principal ventaja frente a otro tipo de dispositivos es que el proceso de obtención (receptor) y transformación de la información química (transductor) en una señal analítica medible se produce en el mismo electrodo (Yogeswaran y Chen, 2008), pues las reacciones catalíticas tienen lugar en la interfase electrodo-disolución. Entre las principales características de estos dispositivos destacan su sensibilidad y selectividad; simplicidad experimental y bajo coste (González y Costa, 2010). El tipo de señal determinará el tipo de sensor electroquímico; por ejemplo, una intensidad de corriente es propia de un sensor amperométrico, mientras que un potencial lo es de un sensor potenciométrico, así como un cambio de conductividad es propia de un sensor conductimétrico (Stradiotto *et al.*, 2003).

Los sensores electroquímicos amperométricos son los utilizados con mayor frecuencia en análisis químico. Este tipo de dispositivos se basa en la aplicación de un potencial fijo sobre un electrodo de trabajo, respecto a un electrodo de referencia. Un tercer electrodo, denominado auxiliar, es necesario en la mayoría de los casos para completar la celda electroquímica (Pérez, 2014). Este tipo de sensor proporciona una corriente eléctrica que es proporcional a la concentración del analito que se está estudiando. Éstos son los más utilizados y versátiles (Retama *et al.*, 2003).

Para este tipo de aplicación es usual emplear electrodos serigrafiados de carbono (*Screen-Printed Carbon Electrodes*, SPCE) que, en un sensor, hacen la función de transductor. Este tipo de electrodos presentan ciertas ventajas para utilizarlos en un sensor, ya que la señal producida consiste en una señal eléctrica que puede ser tratada posteriormente de manera sencilla con ordenadores, además, se compone por un circuito eléctrico que puede ser fácilmente miniaturizado, su costo es modesto y, posee una disposición única de electrodo de trabajo, auxiliar y de referencia en un espacio pequeño.

Por otra parte, sus características desechables permiten la reutilización repetida del mismo electrodo después de un análisis sucesivo (Honeychurch y Hart, 2003).

La voltamperometría cíclica (CV) es una de las técnicas electroquímicas más versátiles para el estudio de especies electroactivas, por esta razón su uso se ha extendido en diferentes campos, actualmente se utiliza para investigaciones en química inorgánica, orgánica, bioquímica, etc. (Flores, 1995). Los voltamperogramas que se obtienen son característicos y dan información inequívoca de las propiedades electroquímicas individuales de los sistemas redox y sobre la cinética de las reacciones heterogéneas de transferencia de electrones y las reacciones químicas acopladas (Heinze, 1984).

Dentro del ámbito de los sensores, se encuentran los biosensores. Un biosensor puede definirse como un dispositivo que contiene un elemento biológico, como parte receptora, y además está en contacto con un sistema transductor adecuado que convierte la señal bioquímica en una señal eléctrica que se puede cuantificar. El elemento transductor es capaz de transformar o convertir la señal bioquímica en una señal de salida.

Un aspecto crítico en el desarrollo de un biosensor electroquímico es la inmovilización de la proteína, ya que la disposición de esta sobre la superficie del electrodo es crucial en la transferencia electrónica (Nikolelis *et al.*, 2013). El tiempo de vida útil de un biosensor depende de la estabilidad del material inmovilizado.

En los últimos años, ha habido un interés considerable en aplicar enzimas inmovilizadas a ensayos específicos (Jia *et al.*, 2002). Para ello se utilizan varios métodos como la adsorción física, adsorción química y encapsulación o atrapamiento. La retención física tiene lugar gracias a las interacciones de Van der Waals, uniones débiles, de tal manera que el elemento no está fijo, sino que puede moverse por la interfase. La unión química se produce porque se forma un enlace químico (iónico o covalente) entre el adsorbato y el adsorbente; éste es un enlace fuerte. En la encapsulación o atrapamiento se produce la incorporación de (bio)moléculas en una matriz adecuada. En el presente estudio, se realiza una inmovilización de la enzima mediante el método de encapsulamiento en una matriz de sílice por el método Sol-Gel, el cual será explicado más adelante.

En el medio marino se han desarrollado biosensores como los descritos por Kröger y Law (2015) capaces de detectar ciertos contaminantes como las toxinas algales, los disruptores endocrinos, los nitratos y nitritos, los ácidos nucleicos, los pesticidas, los fosfatos, los hidrocarburos aromáticos policíclicos y los metales. También se han desarrollado biosensores electroquímicos para detectar la concentración de carbono orgánico en agua de mar como el propuesto por Liang Cheng (2014).

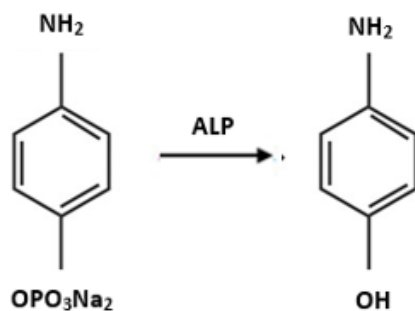
Muchos autores han desarrollado biosensores electroquímicos en el medio marino para detectar el ácido okadaico (OA) que es una toxina lipofílica marina producida por dinoflagelados tóxicos, que pueden acumularse en las glándulas digestivas de mariscos cuando se alimentan de este tipo de microalgas. Esta toxina causa problemas gastrointestinales como náuseas, vómitos y dolor abdominal en seres humanos, cuando pasan a formar parte de su alimentación (Molinero-Abad *et al.*, 2019). Se puede afirmar que, en la actualidad, el desarrollo de sensores en el medio marino está avanzando debido al importante problema de contaminación marina.

Para la fabricación de biosensores se utilizan más comúnmente enzimas debido a su bajo coste, disponibilidad en el mercado y fácil manipulación (Carnicero, 2015).

El presente estudio se basa en una reacción bioquímica formada por un sustrato, una enzima y un producto. Desde el punto de vista químico, las enzimas son macromoléculas formados de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, y azufre combinados, que poseen ciertas características específicas. Las enzimas son catalizadores de naturaleza proteica altamente específicas que aumentan notablemente la velocidad a la que tienen lugar los procesos fisiológicos, producidos por los organismos vivos (Boyer, 2000). En una reacción catalizada por un enzima, la sustancia sobre la que actúa la enzima se llama sustrato.

Un ejemplo de enzima es la fosfatasa alcalina, la cual es una enzima hidrolasa capaz de catalizar la hidrólisis de un enlace químico. Su actividad principal es llevar a cabo la desfosforilación de determinadas moléculas a pH alcalino. La fosfatasa alcalina está presente en casi todas las formas de vida desde algas, bacterias y protozoos hasta plantas y animales superiores, pero también como una enzima libre en aguas naturales y sedimentos (Jansson *et al.*, 1988).

En el caso de los sensores electroquímicos, para llevar a cabo la detección es necesario que el producto enzimático sea electroactivo o genere un cambio en las propiedades eléctricas del medio (Herrasti y Rodríguez, 2014). En los ensayos descritos a continuación, se ha utilizado como enzima la Fosfatasa alcalina (ALP) que cataliza la reacción del sustrato 4-Aminofenil fosfato (PAP) cuando se hidroliza y genera como producto 4-Aminofenol (PAF), el cual puede ser detectado amperométrica y voltamperométricamente (Navarro *et al.*, 2011). La reacción producida es la siguiente:



La gran mayoría de las sustancias que pueden modular la actividad enzimática de la ALP son xenobióticos, compuestos cuya estructura química en la naturaleza es inexistente o infrecuente, al ser sintetizados por el ser humano en el laboratorio. Entre ellos destacarían, por su elevada toxicidad en altas concentraciones, pesticidas y plaguicidas químicos, cuyo uso en la agricultura es desmesurado a nivel mundial desde hace décadas, y se encuentra en aumento constante, debido a la elevada demanda de alimentos por la masificación de la población (Lozano, 2015).

En el artículo propuesto por Zhou *et al.* (2000) se ha estudiado los efectos de cuatro complejos de oxodiperoxovanadato (V) que inhiben la actividad de la fosfatasa alcalina contenida en *Carcinus maenas* (cangrejo verde).

Otro inhibidor de la fosfatasa alcalina es el ion fosfato, el cual es un inhibidor competitivo (Cernbella *et al.*, 1984), se une al sitio activo e impide su unión al sustrato, en este caso al 4-Aminofenil fosfato, lo cual dificulta la formación del 4-Aminofenol.

Se han realizado una gran variedad de ensayos para desarrollar un biosensor capaz de detectar fosfato en el medio marino.

La electroquímica ofrece una amplia gama de posibilidades para lograr una excelente determinación de fosfato en agua de mar ya que este posee las siguientes características: una vida útil larga, una alta precisión, un límite bajo de detección, un tiempo rápido de respuesta, y una buena reproducibilidad (Joínca *et al.*, 2011).

En los océanos existe una gran cantidad de nutrientes, entre ellos se encuentra el fósforo, el cual tiene propiedades únicas que lo califican por su función como un componente esencial del material genético de todos los organismos, y un participante en muchos mecanismos de transformación de energía (Westheimer, 1987). Además, el fósforo tiene una gran importancia como nutriente primario para los organismos fotosintéticos y para los autótrofos. En las aguas profundas de los océanos, casi todo el fósforo disuelto se presenta como fosfato inorgánico simple, mientras que en aguas superficiales aparece como fósforo combinado con materia orgánica disuelta. Su rango

de concentración es muy amplio, desde 0 μM hasta 3 μM , siendo menor en la superficie debido al transporte por organismos y sus detritus hacia la profundidad, donde la concentración es superior (Pilson, 2012). Si se encuentran en cantidad excesiva inducen el crecimiento desmesurado de algas y otros organismos provocando la eutrofización de las aguas. Cuando estas algas y otros vegetales mueren, al ser descompuestos por los microorganismos, se agota el oxígeno y se hace imposible la vida de otros seres vivos (Ordóñez, 2017). Esto puede provocar muchos efectos negativos como la muerte de muchos corales ya que un exceso de fosfato inhibe su calcificación (Walker y Ormond, 1982).

En los ensayos realizados se ha utilizado el método de encapsulamiento de la proteína en una matriz de sílice por el método Sol-Gel. Este método presenta sencillez y facilidad a la hora de la inmovilizar los compuestos, protegiendo tanto la estructura como la funcionalidad de la proteína sin que se modifiquen sus propiedades (Lan *et al.*, 1999). Esta técnica se utiliza en biosensores ópticos y electroquímicos, fases estacionarias para cromatografía de afinidad, etc. (Jin y Brennan, 2002).

El proceso sol-gel se lleva a cabo en dos etapas. La primera etapa es la hidrólisis, en la cual se mezclan los precursores de sílice empleando un catalizador (ácido o básico). Esta etapa lleva a una disolución coloidal metaestable conocida como sol. Y, la segunda etapa es la condensación del sol mediante el aumento del pH y la agregación de coloides, produciéndose un gel.

La finalidad del presente estudio es aplicar técnicas electroquímicas para detectar un nutriente en el medio marino, en este caso el fosfato. Existe una gran variedad de estudios realizados en medio acuoso, pero en agua de mar son muy escasos, por esta razón se ha querido estudiar en el agua de mar.

Existen varios objetivos, en primer lugar, comprobar que el producto de la reacción (PAF) es electroactivo en medio marino, para que pueda ser utilizada la reacción en el estudio. Si es electroactivo, el siguiente objetivo es examinar la actividad catalizadora de la enzima (ALP) en la reacción estudiada, y determinar la capacidad de inhibición que posee el fosfato frente a la ALP. A partir de estos resultados se podrá determinar en estudios futuros la concentración de fosfato a partir de su tasa de inhibición de la ALP en la reacción. El último objetivo trata de aumentar la comodidad a la hora de realizar las medidas una vez desarrollado el sensor, haciéndolo portátil y reutilizable, con lo que se pretende encapsular la proteína en una matriz de sílice por el método de Sol-Gel.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. *Materiales*

2.1.1. *Reactivos*

Se ha preparado agua de mar sintética con una salinidad de 35 psu, para ello se han utilizado las siguientes sales: Cloruro sódico (VWR, Prolabo); Sulfato de sodio (Fisher Scientific); Cloruro potásico (LabKem, Analytical Grade ACS); Bicarbonato sódico (VWR, Prolabo); Bromuro potásico (Merck, pro analysi); Ácido bórico (AnalaR Normapur); Fluoruro sódico (AnalaR Normapur); Cloruro de magnesio hexahidratado (Alfa Aesar); Cloruro de calcio dihidratado (AnalaR Normapur) y Cloruro de estroncio hexahidratado (AnalaR Normapur).

Para la preparación de las disoluciones que se han analizado electroquímicamente, se han empleado los siguientes reactivos: Tris (hidroximetil) aminometano 99,9% (Trizma base; Crystalline, Sigma-Aldrich); 4-Aminofenol hidrocloreto (HPLC, Sigma-Aldrich); 4-Aminofenil fosfato (Electrochemical analysis, Sigma-Aldrich) y Fosfatasa alcalina de mucosa intestinal bovina (BioUltra, Sigma-Aldrich).

Además, para los ensayos de inhibición de la Fosfatasa alcalina con fosfato en agua de mar sintética, se ha utilizado como fosfato el reactivo di-Sodio hidrogenofosfato dodecahidrato (Merck, pro analysi).

Para la preparación de la matriz Sol-Gel de sílice, se han utilizado los siguientes reactivos: Ácido clorhídrico 35% (BioReagent, Sigma-Aldrich) y Tetraetil ortosilicato 98% (TEOS; Reagent, Sigma-Aldrich).

2.1.2. *Electrodos*

Se pueden diferenciar 3 tipos de electrodos: electrodo de trabajo, electrodo auxiliar y electrodo de referencia. En primer lugar, en un electrodo de trabajo es donde ocurren las reacciones electroquímicas de interés. Han de tener una superficie muy bien definida y conviene que sea pequeña (López, 2017). En segundo lugar, en el electrodo auxiliar tiene lugar la reacción con una corriente de signo opuesto a la reacción que ocurre en el electrodo de trabajo. Este electrodo debe ser inerte y sus propiedades no han de afectar al comportamiento del electrodo de trabajo. Además, es recomendable que tenga un área lo suficientemente grande para disminuir su densidad de corriente. Por último, un electrodo de referencia es el que está conectado al electrodo de trabajo y se encarga de medir la diferencia de potencial con respecto a éste.

Para realizar las mediciones electroquímicas se han utilizado electrodos serigrafiados de carbono desechables (ref. DRP-C110 DropSens), de dimensiones de 3,4 cm de largo, 1 cm de ancho y 0,05 cm de grosor. Este tipo de electrodos son adecuados para trabajar con microvolúmenes de 50 μL (Jiang *et al.*, 2016) o sumergiéndolos en disoluciones.

La Figura 2 muestra la estructura de los electrodos que se han utilizado, los cuales se componen por un electrodo de trabajo (W.E.) circular de 4 mm de diámetro, uno auxiliar (C.E.) y uno de referencia (R.E.), los dos primeros son de carbono, mientras que el de referencia Ag/AgCl.

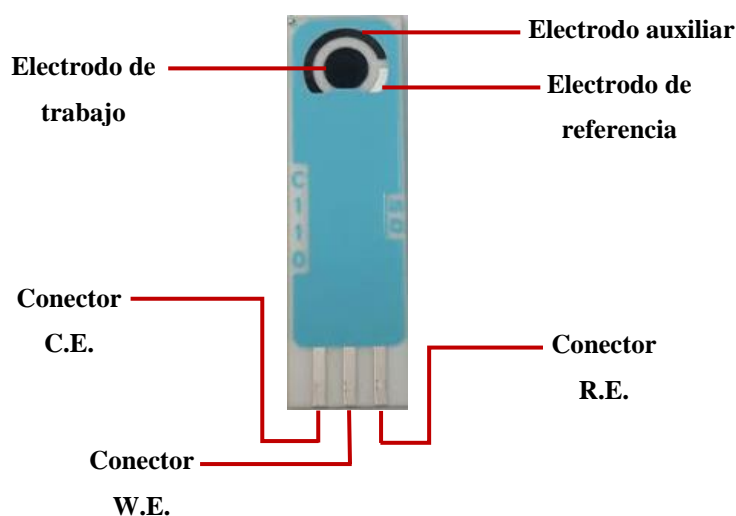


Figura 2. Esquema de un electrodo serigrafiado de carbono DropSens.

2.1.3. Fuentes de corriente y aparatos

Para realizar las mediciones electroquímicas se ha utilizado un potenciostato DropSens μStat 400, conectado por cable al ordenador y al electrodo introducido en la cubeta que contiene la disolución (Figura 3). A través de este sistema se han podido obtener las medidas electroquímicas estudiadas, las cuales se han registrado mediante el programa de ordenador DropView (versión 2.9).



Figura 3. Potenciostato conectado al ordenador y al electrodo introducido en la cubeta.

Para conectar los electrodos serigrafiados al potenciostato se ha utilizado un cable DRP-CAST para estudios en disolución (Figura 3), o bien, un conector DropSens DRP-DSC (Figura 5).



Figura 4. Electrodo introducido en la cubeta con la disolución.



Figura 5. Conector de electrodos DropSens utilizado para el método de gotas.

Para medir el pH de las disoluciones se ha utilizado un pH-metro (CRISON GLP 22).

2.2. Métodos

2.2.1. Preparación de disoluciones

2.2.1.1. Agua de mar sintética

Se ha preparado agua de mar sintética de salinidad 35 psu. Para su preparación se han utilizado diversas sales, cuya masa se ha calculado a partir de los datos recogidos por Kester *et al.* (1976).

Se ha calculada la masa de cada sal que se añade a 1 L de agua destilada para la preparación de agua de mar sintética de 35 psu. Estas cantidades se muestra en la Tabla 1. Se ha preparado un total de 6 L para realizar los experimentos.

Tabla 1. Masa de las sales pesadas añadidas a 1 L de agua destilada para la preparación de agua de mar sintética de 35 psu.

Sales	Masa (g)
NaCl	24,797
Na ₂ SO ₄	4,154
KCl	0,702
NaHCO ₃	0,100
KBr	0,203
H ₃ BO ₃	0,027
NaF	0,031
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10,776
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1,574
SrCl ₂ · 6H ₂ O	0,025

Se ha medido el pH del agua de mar sintética, el cual es de 8,02 que se encuentra dentro del rango de pH del agua de mar natural.

2.2.1.2. Disolución tampón Tris 50 mM

Se ha preparado una disolución empleando Trizma base ya que posteriormente se utiliza en algunos ensayos electroquímicos como medio de la disolución donde se produce la reacción electroquímica.

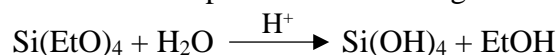
El pH de esta disolución ha resultado ser de 9,96.

2.2.2. Preparación de la matriz de sílice por el método Sol-Gel para el encapsulamiento de la proteína

Se ha preparado una disolución de ácido clorhídrico 35%, de concentración 0,01 M.

Seguidamente, a partir de los datos recogidos por Gamero-Quijano (2014), se han mezclado 9,20 mL de TEOS y 5,80 mL de ácido clorhídrico 0,01M en un vial. A continuación, el vial se ha colocado en un agitador magnético durante dos horas para que se homogenice la disolución, ya que en un inicio se forman dos fases, por encima queda

el TEOS y por debajo la disolución de ácido clorhídrico. Al agitar la mezcla durante 2 horas se produce la hidrólisis del TEOS produciéndose la siguiente reacción de hidrólisis:



El etanol generado en la hidrólisis del TEOS es un cosolvente de ambas fases y tras la misma el vial presenta una sola fase. Finalmente, la disolución se ha colocado en el frigorífico para que se conserve.

El siguiente paso ha sido calcular la cantidad de etanol que se ha formado en la reacción de la hidrólisis de TEOS en medio ácido, ya que el etanol formado podría producir la desnaturalización de la proteína.

Por cada mol de TEOS hay cuatro moles de etanol generado, por tanto, una masa de 2,3 g de etanol por cada 5 mL de TEOS hidrolizado. Para eliminar este etanol se introduce en el rotavapor a vacío hasta que se evaporen los 2,30 g calculados de etanol, para ello hay que ir pesando poco a poco la disolución. En el caso de que se evapore más de la cantidad calculada, se puede añadir a la disolución hidrolizada la cantidad de más pesada de la disolución de ácido clorhídrico 0,01M. Una vez evaporado el etanol, esta disolución es la que se utiliza posteriormente para el encapsulamiento de la proteína.

Seguidamente, se ha preparado la disolución que contiene la proteína. La disolución de Fosfatasa alcalina que se ha estudiado es de concentración 24 μM en tampón Tris 100 mM. Esta disolución también se ha introducido en el frigorífico para su conservación.

Para la formación del gel se mezcla en una cubeta la disolución de TEOS hidrolizado con la disolución que contiene la fosfatasa alcalina con tampón Tris 100 mM. A los treinta segundos aproximadamente toda la mezcla gelifica por la formación de la sílice. El hecho de la gelificación se debe al aumento de pH, por la adición de Tampón Tris 100 mM. Para que se conserven los monolitos, se les ha añadido 1 mL de Tampón Tris 100 mM ya que evita la desecación del monolito de sílice, y finalmente se guarda en el frigorífico.

Posteriormente se han hecho mediciones en las cubetas con el gel (Figura 6).



Figura 6. Cubetas con la matriz de sílice sintetizada por el método Sol-Gel.

2.2.3. Métodos electroquímicos

2.2.3.1. Voltamperometría cíclica

La voltametría o voltamperometría cíclica es una técnica de caracterización electroquímica muy empleada por su sencillez operacional y por la cantidad de información que se puede obtener a partir de un voltagrama o voltamperograma, que es la representación de la curva intensidad-potencial. Consiste en la variación lineal del potencial con el tiempo a la vez que se registra la intensidad de corriente que circula a través del electrodo (Gamero, 2014).

Los instrumentos necesarios para emplear esta técnica son un potenciostato, un generador de señal y un registrador. En primer lugar, un potenciostato aplica una diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia, y hace pasar corriente eléctrica entre el electrodo de trabajo y el electrodo auxiliar. En segundo lugar, un generador de señal está conectado al potenciostato y al registrador y se encarga de hacer variar el potencial del electrodo de trabajo desde un valor inicial hasta otro valor final. Normalmente, esta variación del potencial con el tiempo es lineal. Por último, un registrador se encarga de anotar la variación del potencial con el tiempo, así como la corriente con el tiempo. De esta manera, envía esta información al software de adquisición de datos que se encarga de reproducir la representación I vs E o voltamperograma.

En una experiencia de voltamperometría cíclica, un generador de señales hace variar, a través de un potenciostato, el potencial del electrodo de trabajo (W.E.) desde un valor inicial E_i hasta otro final E_f , y después, invierte el barrido hasta E_2 , de modo que vuelve

al potencial inicial dando lugar a la obtención de diversos voltamperogramas cíclicos (Figura 7).

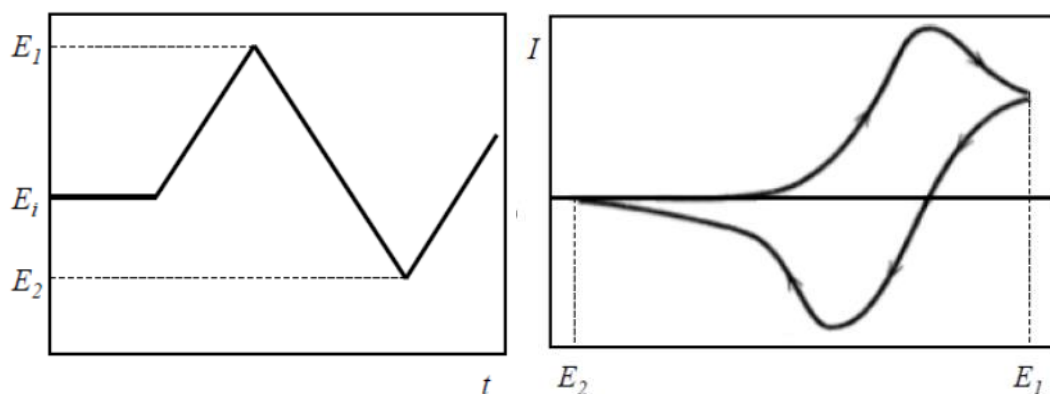


Figura 7. Voltamperograma representado en función del tiempo, y voltamperograma cíclico.

2.2.3.2. Voltamperometría de barrido lineal

La voltamperometría de barrido lineal es un método electroquímico por el cual se mide la corriente con un electrodo de trabajo, mientras se hace un barrido lineal del potencial entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia. La oxidación y la reducción del analito son registrados como un pico en la señal, en el potencial al cual la especie comienza a oxidarse o reducirse.

Con este método ocurre lo mismo que en la voltamperometría cíclica representada en la Figura 7, pero de un potencial inicial E_i pasa hasta un potencial final E_1 sin invertirse el proceso, de modo que no se producen ciclos.

3. PLAN DE TRABAJO

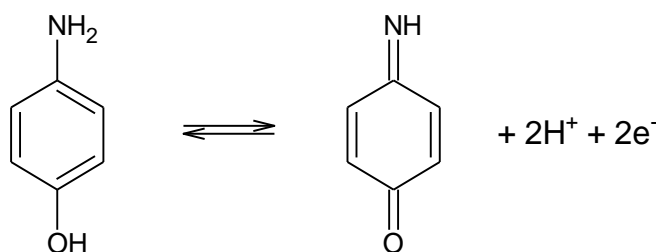
CRONOGRAMA																										
Fases	Actividades	Febrero				Marzo				Abril				Mayo				Junio				Julio				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
Documentación	Búsqueda bibliográfica	■	■	■											■	■	■		■	■	■					
	Adquisición de conocimientos electroquímicos	■	■	■																						
	Preparación agua de mar sintética	■																								
	Análisis electroquímico del PAF	■	■																							
Trabajo de laboratorio	Análisis electroquímico en Tampón Tris			■	■	■	■	■	■																	
	Análisis electroquímico en Agua de mar sintética				■	■	■	■	■																	
	Ensayos de inhibición con Fosfato en Agua de mar						■	■	■	■																
	Preparación y ensayos electroquímicos de la matriz Sol-Gel							■	■	■	■															
Elaboración de la memoria	Análisis de los datos									■	■	■														
	Redacción de la memoria														■	■	■		■	■	■					■

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización electroquímica de 4-Aminofenol

Para comprobar que el producto de la reacción de estudio tiene una respuesta electroquímica tanto en medio marino como en medio acuoso de tampón Tris, se han preparado dos disoluciones, una de 4-Aminofenol hidroclorehídrico (PAF) de concentración 0,5 mM en agua de mar sintética y otra igual, pero en medio acuoso de tampón Tris 50 mM.

La figura 8 muestra un voltamperograma cíclico estabilizado de la disolución preparada de PAF 0,5 mM en Tampón Tris 50 mM. Se observa en el barrido en sentido positivo la aparición de una corriente positiva desde 0,0V relacionada con la oxidación del PAF a para-quinonaimina, según la reacción recogida por Salavagione *et al.* (2004):



Aparece un pico de oxidación en 0,09V con una corriente de 16,43 μA . Cuando se invierte el barrido aparece un pico de reducción a -0,12V con una corriente de -16,5 μA , correspondiente al contraproceso observado anteriormente.

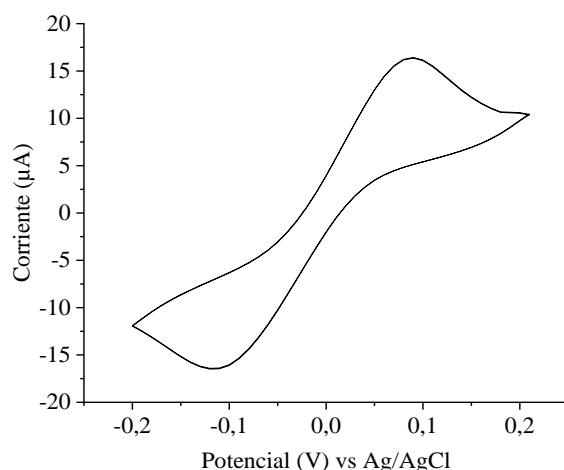


Figura 8. Voltamperograma cíclico estabilizado con velocidad de barrido de 100 mVs^{-1} , de una disolución de PAF 0,5 mM en Tampón Tris 50 mM.

La figura 9 muestra un voltamperograma de barrido lineal de la disolución preparada de PAF 0,5 mM en tampón Tris 50 mM, representado por una línea continua, y, de la

disolución preparada de Tampón Tris 50 mM, representado por una línea discontinua. En la disolución que contiene PAF, se observa en sentido positivo la aparición de una corriente positiva desde 0,0V relacionada con la oxidación del PAF. En esta aparece un pico de oxidación en 0,09V con una corriente de 17,43 μA . Mientras que, en la disolución de tampón Tris, se observa que no hay ningún pico de oxidación ya que la disolución no contiene ninguna especie con actividad electroquímica.

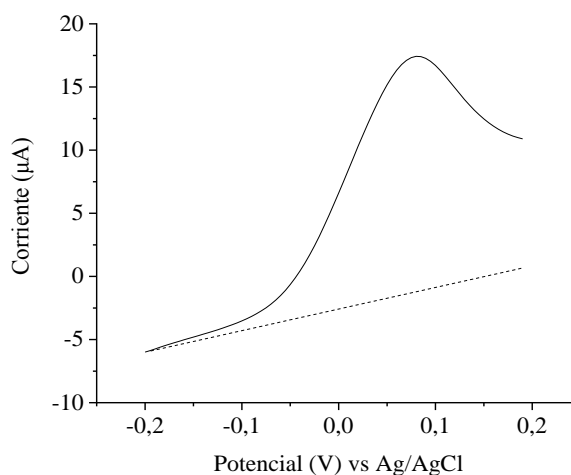


Figura 9. Voltamperograma de barrido lineal con velocidad de barrido de 100 mVs^{-1} , de una disolución de PAF 0,5 mM en tampón Tris 50mM.

La figura 10 muestra un voltamperograma de barrido lineal de la disolución preparada de PAF 0,5 mM en agua de mar sintética, representado por una línea continua, y, de la disolución preparada de agua de mar, representado por una línea discontinua. En la disolución que contiene PAF, se observa en sentido positivo la aparición de una corriente positiva desde 0,0V relacionada con la oxidación del PAF. En esta aparece un pico de oxidación en 0,15V con una corriente de 20,67 μA . Mientras que, en la disolución de agua de mar, se observa que no hay ningún pico de oxidación ya que la disolución no contiene ninguna especie con actividad electroquímica.

Se puede afirmar que el PAF tiene respuesta electroquímica en ambos medios y que la corriente en su pico de oxidación es un poco mayor en agua de mar que en medio acuoso, pero no se aprecian diferencias importantes.

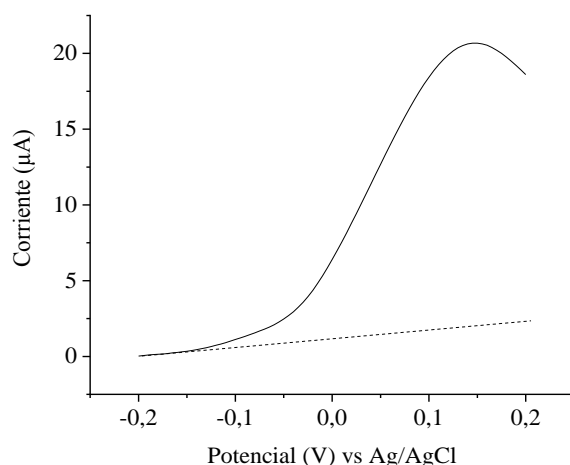


Figura 10. Voltamperograma de barrido lineal con velocidad de barrido de 100 mVs^{-1} , de una disolución de PAF 0,5 mM en agua de mar sintética.

Como ya se ha comprobado que el PAF responde electroquímicamente en ambos medios de estudio, el siguiente paso ha sido realizar la recta de calibrado del PAF representando la corriente (en μA) frente a la concentración de PAF (en μM). Esto se ha representado tanto en medio acuoso como en medio marino.

La figura 11 muestra la recta de calibrado del PAF 0,5 mM en una disolución de tampón Tris 50 mM. Se puede observar como a medida que aumenta el volumen de PAF, aumenta la intensidad de la disolución, es decir, la concentración de PAF es directamente proporcional a la intensidad. Se ha realizado un ajuste lineal de los puntos representados con un valor de pendiente $m = (3,7 \pm 0,4) \times 10^{-2} \text{ A/M}$ y un valor de R^2 de 0,91.

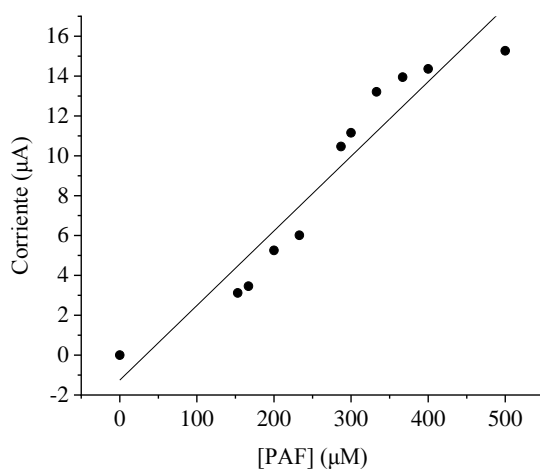


Figura 11. Recta de calibrado del PAF en una disolución de Tampón Tris 50 mM obtenida a partir de la voltamperometría de barrido lineal. Las condiciones experimentales son como las indicadas en la figura

10.

La figura 12 muestra la recta de calibrado del PAF 0,5 mM en una disolución de agua de mar sintética. Se puede observar al igual que en la figura 11 que, a medida que aumenta el volumen de PAF, aumenta la intensidad de la disolución. Se ha realizado un ajuste lineal de los puntos representados con un valor de pendiente $m = (3,6 \pm 0,2) \times 10^{-2} \text{ A/M}$ y un valor de R^2 de 0,97.

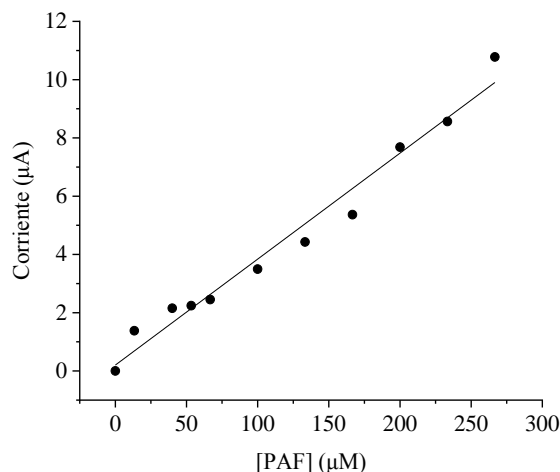


Figura 12. Recta de calibrado del PAF en una disolución de agua de mar obtenida a partir de la voltamperometría de barrido lineal. Las condiciones experimentales son como las indicadas en la figura 10.

No se observan diferencias significativas entre las pendientes del ajuste lineal en la disolución de PAF 0,5 mM en medio acuoso y en agua de mar sintética. De modo que se puede afirmar que el PAF presenta una respuesta electroquímica muy similar en ambos medios.

4.2. Cinética de formación de 4-Aminofenol

Para determinar que concentración de la enzima ALP es la más adecuada para estudiar la formación del PAF, se han realizado varios ensayos electroquímicos. Para ello se ha preparado una disolución de 4-Aminofenil fosfato (PAP) de concentración 10 mM. Como esta disolución se oxida fácilmente, se ha realizado diariamente. Además, se han preparado distintas disoluciones de ALP con un rango de concentración entre 0,6 y 60 μM. Esta disolución se introduce en el frigorífico para su conservación.

Los experimentos se han realizado en cubetas con un volumen total de 3 mL, en ellas se realiza una mezcla de PAP, ALP y agua de mar o tampón Tris 50 mM. En todos los ensayos se mantiene la misma concentración de PAP, es decir, 10 mM. Lo único que

cambia es la concentración de ALP, y el medio en el que se realiza el ensayo (medio acuoso con tampón Tris 50 mM o medio con agua de mar sintética).

La figura 13 muestra un voltamperograma de barrido lineal de una disolución que contiene PAP 10 mM y ALP 6 μ M en una cubeta enrasada hasta 3 mL con tampón Tris 50 mM, representado por una curva continua, frente a una curva discontinua de una disolución que contiene únicamente tampón Tris 50 mM. El gráfico representa la corriente (en μ A) al ir formándose el PAF, frente el potencial (en V). En la curva continua, se observa en sentido positivo la aparición de una corriente positiva desde 0,0V relacionada con la oxidación del PAF a para-quinonaimina. Esta curva se ha medido a los 16 minutos tras producirse la mezcla y se ha obtenido un pico de oxidación máximo en una corriente de 21,42 μ A. Mientras que, en la curva discontinua, que solo contiene tampón se observa una tendencia lineal, sin pico de oxidación ya que esta no contiene el PAF que es la especie electroactiva.

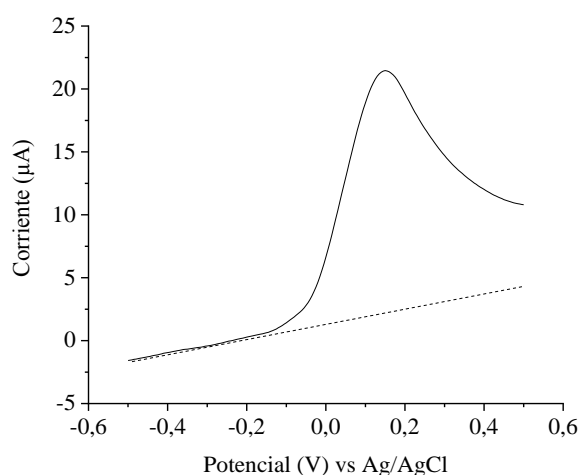


Figura 13. Voltamperograma de barrido lineal con velocidad de barrido de 100 mVs^{-1} , de una disolución de PAP 10 mM y ALP 6 μ M en tampón Tris 50 mM frente a otro únicamente con tampón Tris 50 mM.

Para estudiar la formación del PAF, se ha estudiado el crecimiento de la corriente frente al tiempo. Para ello, se han realizado una serie de voltamperogramas en un intervalo de tiempo medido en segundos. A partir de los voltamperogramas se ha podido obtener la intensidad del pico de oxidación del PAF a cada instante medido, de modo que se han generado representaciones de corriente (en μ A) frente a tiempo (en s).

La figura 14 representa la intensidad, I (en μ A) frente al tiempo, t (en s), de una disolución que contiene PAP 10 mM y ALP 6 μ M en una cubeta enrasada hasta 3 mL con Tampón Tris 50 mM.

En esta figura se puede observar que al inicio (entre $t=0$ y $t=200$ s) la intensidad del pico crece linealmente con el tiempo. Al cabo de los 200 segundos se observa un crecimiento más lento de esta intensidad. Al cabo de 600 segundos se obtiene un valor de intensidad prácticamente constante. Esto se debe a que tras este instante todo el PAP presente en la disolución ha sido transformado en PAF. Por tanto, la corriente medida al cabo del experimento ($I=18,875 \mu\text{A}$) corresponde a una concentración de PAF de 10 mM. La parte lineal al inicio de la gráfica se puede ajustar a una recta con pendiente $m=0,07 \pm 0,01 \mu\text{A/s}$, la cual se relaciona con la actividad de la proteína.

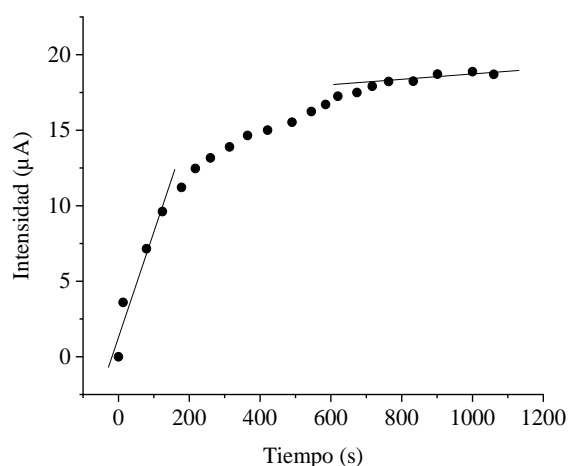


Figura 14. Representación de la intensidad (μA) frente al tiempo (s) de una disolución de PAP 10 mM y ALP 6 μM en tampón Tris 50 mM obtenida a partir de la voltamperometría de barrido lineal. El resto de condiciones experimentales son como las indicadas en la figura 13.

Con el fin de analizar estos datos y poder comparar entre distintos experimentos, la corriente medida fue normalizada a la corriente del máximo (I_{norm}), de modo que $I_{\text{norm}}=I/I_{\text{máx}}$. Por otra parte, el ajuste lineal en el periodo de crecimiento más rápido tiene una pendiente (m) que se puede relacionar con la velocidad de hidrólisis del PAP a PAF, de modo que $m=I_{\text{norm}}/t$ (en s^{-1}).

La figura 15 representa la intensidad normalizada frente al tiempo (en s), de una disolución que contiene PAP 10 mM y ALP 6 μM en una cubeta enrasada hasta 3 mL con tampón Tris 50 mM.

Se observa un crecimiento muy rápido que viene representado por un ajuste lineal de pendiente $m=(3,7 \pm 0,7) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ entre 0 y 200 segundos. Al cabo de 700 segundos todo el PAP se ha hidrolizado a PAF.

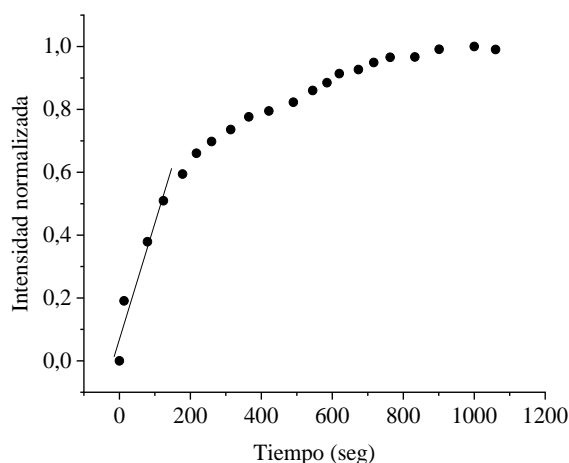


Figura 15. Representación de la intensidad normalizada frente al tiempo (s) de una disolución de PAP 10 mM y ALP 6 μ M en tampón Tris 50 mM obtenida a partir de la voltamperometría de barrido lineal. El resto de condiciones experimentales son como las indicadas en la figura 13.

La figura 16 muestra la representación de la intensidad normalizada frente al tiempo (en s), de una disolución que contiene PAP 10 mM y ALP 0,6 μ M en una cubeta enrasada hasta 3 mL con tampón Tris 50 mM.

En esta figura se puede observar al inicio un periodo de crecimiento más rápido cuya pendiente tiene un valor de $m = (2,4 \pm 0,4) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ hasta $t = 300 \text{ s}$, y otro de estabilización de la curva. En este caso, se ha disminuido la concentración de enzima catalizadora ALP hasta 0,6 μ M, con lo que el crecimiento de la intensidad es mucho más lento. Como la concentración de ALP es baja, la hidrólisis de PAP a PAF se produce más lentamente, hasta que llega un momento en el que la intensidad se va estabilizando, es decir, ya todo el PAP se ha hidrolizado a PAF, lo cual se puede observar aproximadamente a los 17 minutos, produciéndose la máxima intensidad a los 23 minutos.

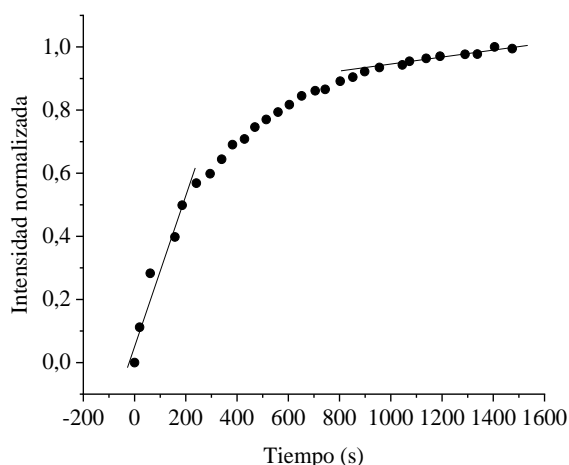


Figura 16. Representación de la intensidad frente al tiempo (s) de una disolución de PAP 10 mM y ALP 0,6 μM en tampón Tris 50 mM.

Para estudiar la velocidad de formación del PAF en medio acuoso de tampón Tris 50 mM, se han realizado ensayos con distintas concentraciones de ALP añadida a las disoluciones, entre un rango de 0,6 y 60 μM . La figura 17 muestra la velocidad de formación del PAF (en 10^{-3} s^{-1}) que se relaciona con las pendientes de las gráficas que representan la intensidad normalizada frente al tiempo (en s). Se puede observar que a medida que aumenta la concentración de ALP añadida, la velocidad de formación del PAF es más rápida, es decir, es directamente proporcional a la concentración de ALP (Sumnicht, 2013), y por este motivo, la reacción de hidrólisis de PAP a PAF se acelera. La distribución de los puntos se ajusta linealmente por una recta con un R^2 de 0,94 y una pendiente $m = (0,27 \pm 0,03) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}/\mu\text{M}$.

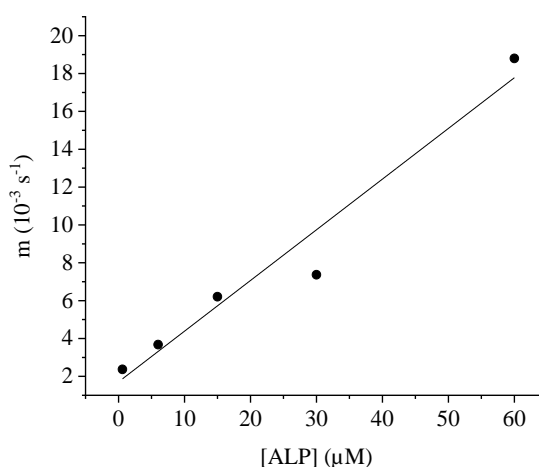


Figura 17. Representación de la velocidad de formación del PAF (en 10^{-3} s^{-1}) frente a la concentración de ALP (en μM) añadida a las disoluciones estudiadas en medio acuoso de tampón Tris 50 mM.

4.3. Cinética de formación de 4-Aminofenol en agua de mar sintética

Se han realizado los mismos ensayos en medio acuoso de Tampón Tris 50 mM que en agua de mar sintética, para comprobar la efectividad del método electroquímico utilizado, observar si existe alguna diferencia entre ambos medios, y estudiar la velocidad de formación del PAF a distintas concentraciones de ALP en medio marino.

Para ello, se ha preparado una disolución de 4-Aminofenil fosfato (PAP) de concentración 10 mM en agua de mar sintética. Y se han realizado ensayos con un rango de concentración de ALP entre 6 y 60 μM .

La figura 18 muestra la representación de la intensidad normalizada frente al tiempo (en s), de una disolución que contiene PAP 10 mM y ALP 6 μM en una cubeta enrasada hasta 3 mL con agua de mar sintética.

Se puede observar que el ajuste lineal hace referencia al máximo crecimiento de la intensidad, el cual se produce durante los 4 primeros minutos desde el instante en que se mezcla la disolución y presenta una velocidad de formación de PAF con un valor $m = (4,4 \pm 0,7) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. A partir de este momento se puede observar que la intensidad deja de crecer y empieza a mantenerse estable, lo que significa que la hidrólisis de PAP a PAF está terminando. Además, el instante en que la intensidad es máxima se produce en este caso a los 17 minutos. La velocidad de formación del PAF en agua de mar es un poco mayor que en medio acuoso de tampón Tris cuya velocidad de formación es $m = (3,7 \pm 0,7) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

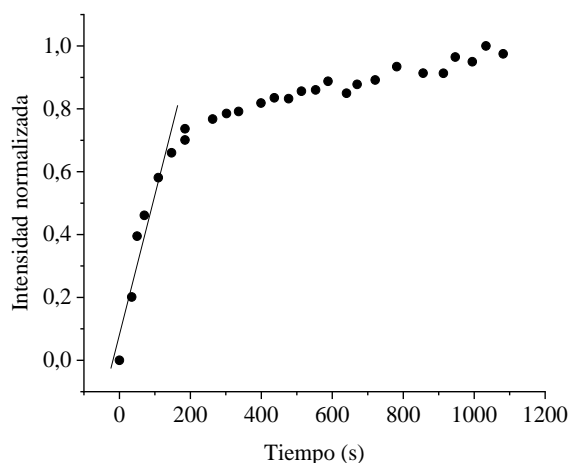


Figura 18. Representación de la intensidad normalizada frente al tiempo (en s) de una disolución de PAP 10 mM y ALP 6 μM en agua de mar sintética.

Para estudiar la velocidad de formación del PAF en medio marino se han realizado ensayos con distintas concentraciones de ALP. La figura 19 muestra la velocidad de formación del PAF (en $10^{-3}s^{-1}$) frente al tiempo (en s). Este estudio se ha realizado con un rango de concentraciones de ALP entre 6 y 60 μM . Se puede observar que a medida que aumenta la concentración de ALP que se añade, la velocidad de formación del PAF es más rápida, es decir, esta es directamente proporcional a la concentración de ALP.

En comparación con un medio acuoso de tampón Tris, en medio marino la distribución de los puntos no es lineal. Se puede observar como en un inicio, la velocidad de formación del PAF es más rápida a bajas concentraciones de ALP en agua de mar que en medio acuoso de tampón Tris 50 mM, mientras que con una concentración de 60 μM de ALP, la velocidad de formación del PAF pierde la linealidad, esto puede deberse algún proceso de inhibición de la proteína a causa de la alta salinidad del medio.

Se puede afirmar que la ALP muestra una respuesta catalítica sobre la reacción de hidrólisis de PAP a PAF, tanto en medio acuoso como en medio marino.

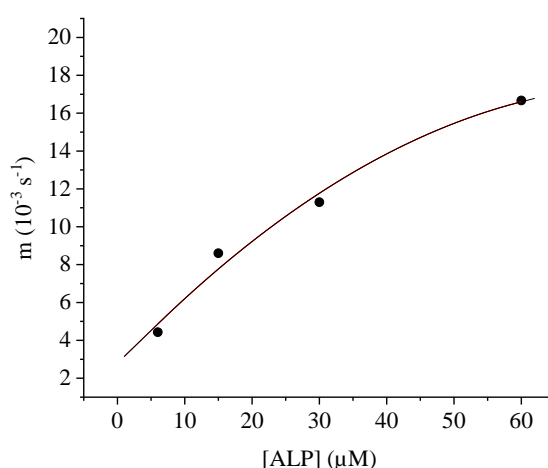


Figura 19. Representación de la velocidad de formación del PAF (en $10^{-3}s^{-1}$) frente a la concentración de ALP (en μM) añadida a las disoluciones estudiadas en agua de mar sintética.

Se puede afirmar que no existen diferencias significativas entre la velocidad de formación de PAF en agua de mar sintética y en medio acuoso para concentraciones de ALP menores de 30 μM . La ALP cataliza la reacción de formación del PAF en ambos medios del mismo modo, es decir, que la presencia de sales disueltas en el agua de mar no genera dificultades a la hora de producirse la hidrólisis, al menos en concentraciones bajas de proteína.

4.4. Ensayos de inhibición con fosfato en agua de mar sintética

Como el fosfato es un inhibidor de la fosfatasa alcalina, se han realizado ensayos con adición de fosfato a distintas concentraciones en la disolución de agua de mar sintética, para estudiar el efecto de la inhibición sobre el catalizador de la reacción y poder desarrollar un sensor de fosfato basado en este proceso de inhibición. El rango de concentraciones de fosfato que se ha utilizado se encuentra entre 0 y 3 μM , ya que es la concentración más común en el medio marino.

Por una parte, la concentración de sustrato PAP es de 10 mM, es decir, la misma que en los ensayos anteriores. En estos ensayos se ha utilizado únicamente la concentración de ALP de 6 μM ya que es la que ha dado buenos resultados en ambos medios. Por último, se ha enrasado en la cubeta hasta 3 mL con agua de mar con distintas concentraciones de fosfato en cada prueba, estas han sido de 0,3 μM , 1 μM , 2 μM y 3 μM .

La figura 20 muestra la representación de la intensidad normalizada frente al tiempo (en s), de una disolución que contiene PAP 10 mM y ALP 6 μM en una cubeta enrasada hasta 3 mL con agua de mar sintética con fosfato 0,3 μM . Se puede observar que a los 3 primeros minutos se produce el máximo crecimiento de intensidad, con una velocidad de formación del PAF de valor $m = (3,8 \pm 0,9) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, y que, a partir de este momento los valores de intensidad se van estabilizando de modo que ya se ha producido la formación del PAF. Además, la hidrólisis del PAP se produce más lentamente que en caso de la misma disolución sin fosfato (Figura 18) cuya velocidad de formación del PAF es de $(4,4 \pm 0,7) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, esto es debido a que, en dos disoluciones con las mismas condiciones, la que contiene fosfato crece más lentamente.

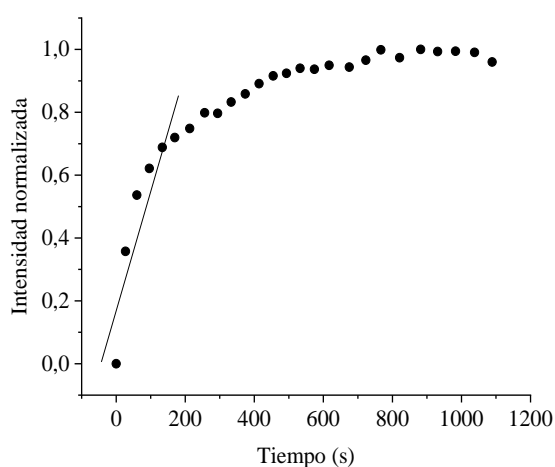


Figura 20. Representación de la intensidad normalizada frente al tiempo (en s) de una disolución de PAP 10 mM y ALP 6 μM en agua de mar sintética con fosfato 0,3 μM .

La figura 21 muestra la representación de la intensidad normalizada frente al tiempo (en s), de una disolución que contiene PAP 10 mM y ALP 6 μM en una cubeta enrasada hasta 3 mL con agua de mar sintética con fosfato 2 μM . El máximo crecimiento de intensidad se da en un intervalo de 7 minutos, es decir, es mucho más lento que en la figura 20, y esto es debido a que la concentración de fosfato en este ensayo es superior. A partir de ese instante se estabiliza la intensidad de modo que el PAF ya se ha formado. Además, la velocidad de formación del PAF que tiene un valor $m = (2,4 \pm 0,1) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ en agua de mar sintética con fosfato de concentración 2 μM , es más lenta que a una concentración de fosfato de 0,3 μM cuya velocidad de formación es de $m = (3,8 \pm 0,9) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

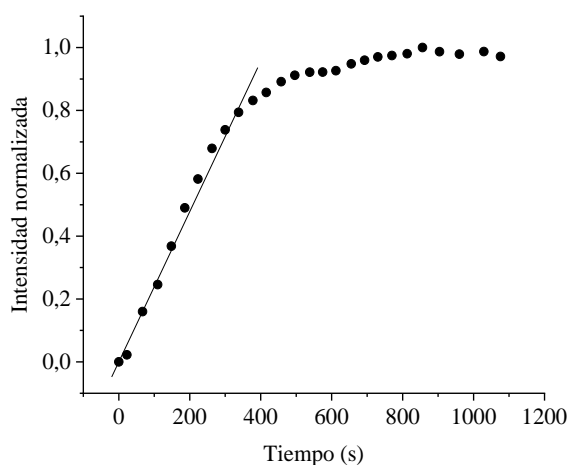


Figura 21. Representación de la intensidad normalizada frente al tiempo (en s) de una disolución de PAP 10 mM y ALP 6 μM en agua de mar sintética con fosfato 2 μM .

La figura 22 representa la velocidad de formación del PAF, m (en 10^{-3}s^{-1}) frente a la concentración de fosfato, $[\text{PO}_4^{3-}]$ (en μM), que se ha añadido a las disoluciones. Se puede observar que en un rango de concentración de fosfato entre 0 y 1 μM la velocidad de formación del PAF disminuye linealmente a medida que se aumenta la concentración de fosfato. En el rango de concentración entre 1 y 3 μM la velocidad de formación del PAF se mantiene más constante, con lo que el rango de mayor interés es de 0 a 1 μM ya que la ALP tiene una mayor sensibilidad en presencia del fosfato. Con esto se puede observar que a medida que aumenta la concentración de fosfato en la disolución, la velocidad de formación del PAF disminuye, lo cual es debido a que el fosfato inorgánico es un inhibidor competitivo de la actividad de ALP en agua de mar (Orhanovi y Pavela-vran 2000).

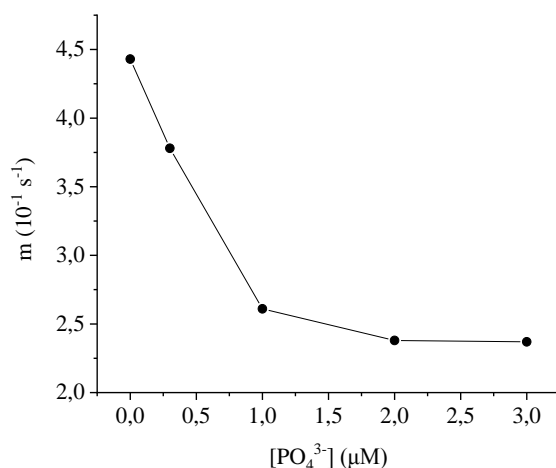


Figura 22. Representación de la velocidad de formación del PAF (en $10^{-3}s^{-1}$) frente a la concentración de fosfato en agua de mar añadido a las disoluciones.

4.5. Desarrollo de un sensor: encapsulamiento de la Fosfatasa Alcalina

Para aumentar la comodidad a la hora de tomar muestras en el agua del mar y de realizar las medidas, se ha encapsulado la enzima ALP en una matriz de sílice por el método de Sol-Gel explicado anteriormente. Seguidamente, se han realizado el mismo tipo de ensayos estudiados anteriormente, pero con la proteína encapsulada dentro de esta matriz.

Para comprobar que el fosfato inhibe la ALP estando encapsulada, se han realizado ensayos en agua de mar sin fosfato y con fosfato de concentración 2 μM ya que anteriormente se ha obtenido una buena respuesta.

La figura 23 representa la intensidad normalizada frente al tiempo (en s), de una disolución compuesta de PAP 10 mM y de ALP 6 μM encapsulada en una matriz de sílice por el método de Sol-Gel, en una cubeta enrasada hasta 3 mL con agua de mar sintética sin fosfato. Se puede observar que la tendencia es distinta a la de los ensayos que tienen la ALP en disolución. En un inicio, se puede distinguir un crecimiento en la intensidad que dura unos 2 minutos, y que posteriormente, la curva toma otra tendencia totalmente distinta donde el crecimiento de la intensidad es más lento y se ajusta linealmente con un valor de $m = (6,53 \pm 0,13) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. La mayor velocidad observada al inicio se debe a la reacción de PAP catalizada por la ALP que se encuentra en las zonas externas de monolito de sílice. La formación total del PAF tarda 23 minutos en este caso, pero tarda 4 minutos en empezar a estabilizarse la formación del PAF que cuando la proteína está en disolución.

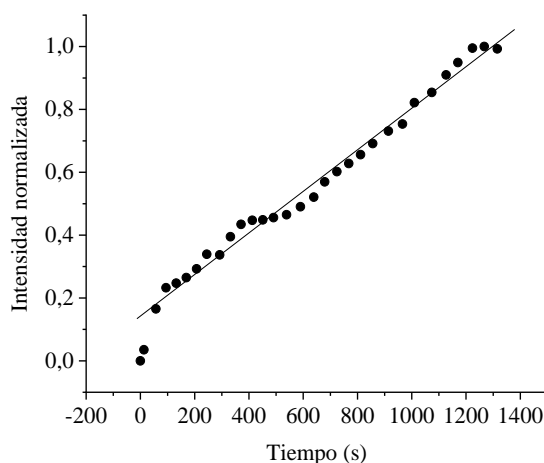


Figura 23. Representación de la intensidad normalizada frente al tiempo (en s) de una disolución de PAP 10 mM y ALP 6 μ M encapsulada en una matriz sílice por el método Sol-Gel, en agua de mar sintética sin fosfato.

Por otra parte, se puede afirmar que la cinética de formación del PAF cuando la proteína está encapsulada es más lenta que en disolución. Esto es debido a que el PAP tiene que penetrar a través de los poros del monolito de sílice para reaccionar con la proteína encapsulada. Esta proteína encapsulada es posible que tenga menor actividad en la reacción de hidrólisis que cuando se encuentra libre en disolución.

Además, el PAF generado en la hidrólisis del PAF debe difundir a través de los poros del material para entrar en contacto con el electrodo y este proceso también puede estar impedido por la presencia del monolito. Todos estos efectos pueden hacer que la formación y detección del producto sea más lenta que en disolución (Dunn y Zink, 1997).

La figura 24 representa la intensidad normalizada frente al tiempo (en s), de una disolución compuesta por PAP 10 mM y ALP 6 μ M encapsulada en la matriz de sílice por el método Sol-Gel, en una cubeta enrasada hasta 3 mL con agua de mar sintética con fosfato de concentración 2 μ M.

Se puede observar que al igual que en la figura 23 aparece una tendencia inicial hasta los 120 segundos con un crecimiento de intensidad más rápido similar a la que se observó en el experimento anterior y causado por la reacción del sustrato en con la enzima ubicada en las zonas externas del monolito. A partir de este instante, la tendencia de crecimiento es menor y queda representada por un ajuste lineal cuya pendiente tiene un valor de $m = (5,3 \pm 0,2) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. En comparación con la misma disolución sin fosfato (Figura 23) se puede observar que el crecimiento de la intensidad en esta figura es menor. Esto es debido

a la adición de fosfato que ralentiza el proceso de formación del PAF, ya que inhibe a la proteína fosfatasa alcalina que cataliza la reacción.

Por tanto, se puede afirmar que la ALP presenta actividad catalizadora en la reacción de hidrólisis de PAP a PAF cuando se encapsula en la matriz de sílice, con lo que sí se puede desarrollar un biosensor electroquímico para detectar fosfato en medio marino utilizando este método de encapsulamiento de proteína.

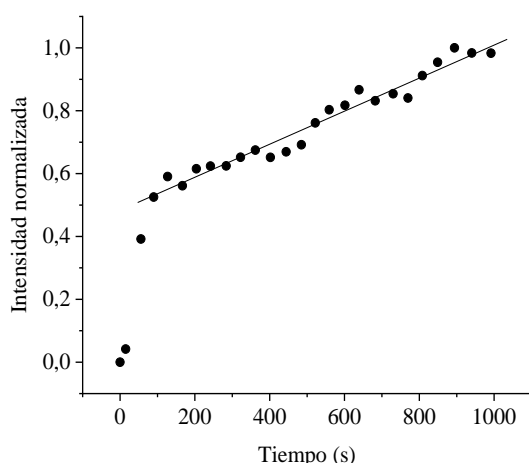


Figura 24. Representación de la intensidad normalizada frente al tiempo (en s) de una disolución de PAP 10 mM y ALP 6 μ M encapsulada en una matriz de sílice por el método Sol-Gel, en agua de mar sintética con fosfato 2 μ M.

5. CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado un prototipo de sensor electroquímico para detectar fosfato en agua de mar a través de la inhibición de la enzima Fosfatasa alcalina.
2. El producto de la reacción estudiada (4-aminofenol) presenta actividad electroquímica muy similar tanto en medio acuoso tamponado como medio marino.
3. La fosfatasa alcalina cataliza la hidrólisis del sustrato (4-Aminofenil fosfato) de la reacción estudiada. En medio marino la hidrólisis se produce más rápidamente con una baja concentración de la enzima catalizadora que en medio acuoso tamponado. En agua de mar la actividad de la enzima se inhibe parcialmente a concentraciones mayores de 30 μ M.
4. El ion fosfato inhibe la actividad catalizadora de la Fosfatasa alcalina. El rango de concentración de fosfato en el que la Fosfatasa alcalina presenta mayor sensibilidad a la presencia del fosfato es inferior a 1 μ M. A mayores concentraciones la velocidad de

formación del producto se encuentra también inhibida, pero es insensible a un aumento de la concentración de fosfato.

5. Cuando se encapsula la proteína en una matriz de sílice a partir del método Sol-Gel, la hidrólisis del sustrato y la detección del producto se produce más lentamente que en disolución.

6. La Fosfatasa alcalina presenta actividad catalizadora en la reacción estudiada cuando se encapsula en la matriz de sílice. La actividad de la proteína encapsulada es inhibida por la presencia de fosfato en disolución con lo que se puede desarrollar un biosensor electroquímico para detectar fosfato en medio marino utilizando este método.

1. A prototype electrochemical sensor has been developed to detect phosphate in seawater through the inhibition of the alkaline phosphatase enzyme.

2. The product of the reaction studied (4-aminophenol) has very similar electrochemical activity in buffered aqueous medium and marine medium.

3. The alkaline phosphatase catalyses the hydrolysis of the substrate (4-Aminophenyl phosphate) of the reaction studied. In a marine environment, hydrolysis occurs faster with a low concentration of the catalytic enzyme than in a buffered aqueous medium. In seawater, the activity of the enzyme does partially inhibit at concentrations greater than 30 μM .

4. The phosphate ion inhibits the catalytic activity of alkaline phosphatase. The range of phosphate concentration in which alkaline phosphatase is most sensitive to the presence of phosphate is less than 1 μM . At higher concentrations the rate of product formation is also inhibited, but it is insensitive to an increase in phosphate concentration.

5. When the protein is encapsulated in a silica matrix from the Sol-Gel method, hydrolysis of the substrate and detection of the product occurs more slowly than in solution.

6. Alkaline Phosphatase presents catalytic activity in the studied reaction when it is encapsulated in the silica matrix. The activity of the encapsulated protein is inhibited by the presence of phosphate in solution, whereby an electrochemical biosensor can be developed to detect phosphate in a marine environment using this method.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Boyer, R. (2000). *Conceptos en bioquímica*. International Thomson Editores, 13(60): 17-44.
- Carnicero Gómez, I. (2015). *Efecto catalítico de las nanopartículas de TiO₂ en sensores y biosensores de grafito*, trabajo de fin de grado Universidad de Valladolid, 195 pp.
- Cembella, A. D., Antia, N. J., Harrison, P. J., and Rhee, G. Y. (1984). The utilization of inorganic and organic phosphorous compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspective: part 2. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 11(1): 13-81.
- Escobar, J. (2002). La contaminación de los ríos y su efecto en las áreas costeras y el mar. *Publicación de las Naciones Unidas. ISSN electrónico*, 1680-9025.
- Flores, E. (1995). Voltametría cíclica: la espectroscopía electroquímica. Parte I. *Revista de Química*, 9(2): 165-172.
- Gómez Moliné, M. R., and Alegret, S. (1997). Los sensores químicos. Una aportación a la instrumentación analítica. *Educación Química*, 8(4): 191-196.
- González García, M. B. and Costa García, A. (2010) 'Los biosensores electroquímicos : herramientas de la analítica y del diagnóstico clínico', *Real Academia Nacional de Farmacia*, 11: 197–222.
- Heinze, J. (1984) 'Cyclic Voltammetry - "Electrochemical Spectroscopy"', *Angew. Chem. Int. Ed.*, 23(11): 831–918.
- Herrasti Sainz, Z., and Rodríguez Viejo, J. (2015). *Superficies nanoestructuradas para el desarrollo de biosensores electroquímicos e integración en un sistema de detección portable*. Tesis doctoral Universidad Autónoma de Barcelona, 272 pp.
- Honeychurch, K. C., & Hart, J. P. (2003). Screen-printed electrochemical sensors for monitoring metal pollutants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(7): 456-469.
- Jansson, M., Olsson, H. and Pettersson, K. (1988) 'Phosphatases; origin, characteristics and function in lakes', *Hydrobiologia*, 170(1): 157–175. doi: 10.1007/BF00024903.
- Jiang, H., Islam, M. S., Sazawa, K., Hata, N., Taguchi, S., Nakamura, S. and Kuramitz, H. (2016) 'Development of an electrochemical bioassay based on the alkaline phosphatase activity of *Chlamydomonas reinhardtii* to assess the toxicity of heavy metals', *International Journal of Electrochemical Science*, 11(6): 5090–5102. doi: 10.20964/2016.06.65.

Jin, W. and Brennan, J. D. (2002) 'Properties and applications of proteins encapsulated within sol-gel derived materials', *Analytica Chimica Acta*, 461(1): 1–36. doi: 10.1016/S0003-2670(02)00229-5.

Jońca, J., Fernández, V. L., Thouron, D., Paulmier, A., Graco, M., & Garçon, V. (2011) 'Phosphate determination in seawater: Toward an autonomous electrochemical method', *Talanta*, 87(1): 161–167. doi: 10.1016/j.talanta.2011.09.056.

Kathijotes, N. (2011). Wastewater reuse in coastal areas–Nutrient flow evaluation. *Procedia Environmental Sciences*, 4: 260-265. doi: 10.1016/j.proenv.2011.03.031.

Kester, D. R., Duedall, I. W., Connors, D. N., and Pytkowicz, R. M. (1967). Preparation of artificial seawater 1. *Limnology and oceanography*, 12(1):176-179.

Kissinger, P. T. (2005). Biosensors a perspective. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(12): 2512-2516.

Kröger, S., Piletsky, S. and Turner, A. P. F. (2002) 'Biosensors for marine pollution research, monitoring and control', *Marine Pollution Bulletin*, 45(1–12): 24–34. doi: 10.1016/S0025-326X(01)00309-5.

Lan, E., Dave, B., Fukuto, J., Zink, J., and Valentine, J. (1999). Synthesis of sol-gel encapsulated heme proteins with chemical sensing properties. *Journal of Materials Chemistry*, 9(1):45-53.

López-Bernabeu, S. (2017). Transferencia Electrónica Directa a Citocromo c Inmovilizado sobre Electrodo Modificados. Aplicación en Sensores Amperométricos.

Lozano Navarro, A. J. (2017). Desarrollo de un biosensor fluorescente para la detección de actividad de la fosfatasa alcalina basado en polímeros conjugados, 18: 1-35.

Molinero-Abad, B., Perez, L., Izquierdo, D., Escudero, I., and Arcos-Martinez, M. J. (2019) 'Sensor system based on flexible screen-printed electrodes for electrochemical detection of okadaic acid in seawater', *Talanta*. Elsevier B.V., 192: 347–352. doi: 10.1016/j.talanta.2018.09.072.

Navarro, E. L., Sánchez, D. C. and Flores, N. C. (2011) 'Alcalinas', 1: 1–7.

Nikolelis, D. P., Varzakas, T., Erdem, A., and Nikoleli, G. P. (Eds.). (2013). *Portable biosensing of food toxicants and environmental pollutants*. CRC Press, 806 pp.

Ordóñez Ramirez, V. (2017) 'Contaminación del agua', *Ingenius*, (1). doi: 10.17163/ings.n1.2007.04.

Orhanovi, S. and Pavela-vran, M. (2000) 'Alkaline Phosphatase Activity in Seawater : Influence of Reaction Conditions on the Kinetic Parameters of ALP', 73(3): 819–830.

Pérez, A. C., Arcos-Martínez, M. J., y Renedo, O. D. (2014). *Desarrollo y aplicación de sensores y biosensores electroquímicos para la determinación de contaminantes medioambientales y agroalimentarios*. Tesis doctoral Universidad de Burgos, 233 pp.

Pilson, M. E. (2012). *An Introduction to the Chemistry of the Sea*. Cambridge university press, 523 pp.

Retama, J. R., Lopez-Ruiz, B. and Lopez-Cabarcos, E. (2003) 'Microstructural modifications induced by the entrapped glucose oxidase in cross-linked polyacrylamide microgels used as glucose sensors', *Biomaterials*, 24(17): 2965–2973. doi: 10.1016/S0142-9612(03)00095-4.

Gamero-Quijano, A. (2014). *Desarrollo de electrodos modificados con matrices de sílice para posibles aplicaciones en sensores y biosensores electroquímicos*. Tesis doctoral, Universidad de Alicante.

Salavagione, H. J., Arias, J., Garcés, P., Morallón, E., Barbero, C., & Vázquez, J. L. (2004). Spectroelectrochemical study of the oxidation of aminophenols on platinum electrode in acid medium. *Journal of electroanalytical Chemistry*, 565(2): 375-383.

Stradiotto, N. R., Yamanaka, H. and Zandoni, M. V. B. (2003) 'Electrochemical sensors: A powerful tool in analytical chemistry', *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14(2): 159–173. doi: 10.1590/S0103-50532003000200003.

Sumnicht, S. (2013) 'BIOL 366L Lab Manual', *KB Books*, p. 2.1-2.7.

Walker, D. I. and Ormond, R. F. G. (1982) 'Coral death from sewage and phosphate pollution at Aqaba, Red Sea', *Marine Pollution Bulletin*, 13(1): 21–25. doi: 10.1016/0025-326X(82)90492-1.

Westheimer, F. H. (1987) 'Why nature chose phosphates', *Science*, 235(4793): 1173–1178. doi: 10.1126/science.2434996.

Yogeswaran, U., & Chen, S. M. (2008). A review on the electrochemical sensors and biosensors composed of nanowires as sensing material. *Sensors*, 8(1), 290-313.

Zhou, X. W., Chen, Q. X., Chen, Z., He, Z. Q., & Zhou, H. M. (2000) 'Effects of Oxodiperoxovanadate (V) Complexes on the Activity of Green Crab (*Scylla serrate*) Alkaline Phosphatase', *Biochemistry (Moscow)*, 65(12): 1424–1428. doi: 10.1023/A:1002813125201.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a mi tutor, Paco Montilla, la dedicación, atención y disponibilidad que ha tenido durante todo el desarrollo del trabajo, tanto en la fase experimental de laboratorio como en la redacción y corrección de la memoria, especialmente por haberme permitido descubrir nuevas técnicas y conocimientos.

Asimismo, me gustaría agradecer el apoyo brindado por el grupo de investigación de electroquímica, donde he realizado la parte experimental. Finalmente, agradecer a mis padres, mi hermano y amigos la paciencia que han tenido a lo largo de todo este periodo.